

Rapid recruitment of BRCA1 to DNA doublestrand breaks is dependent on its association with Ku80(  
**家族性乳癌原因遺伝子BRCA1のDNA二本鎖切断への速  
い集積はKu80との相互作用に依存する**)

著者	魏 雷震
号	77
学位授与番号	2534
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/45743">http://hdl.handle.net/10097/45743</a>

氏 名 (本籍)	ウエイ 魏	レイ 雷	ツェン 震
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	医 博 第 2 5 3 4 号		
学位授与年月日	平 成 20 年 3 月 25 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻		
学 位 論 文 題 目	Rapid recruitment of BRCA1 to DNA double-strand breaks is dependent on its association with Ku80 (家族性乳癌原因遺伝子 BRCA1 の DNA 二本鎖切断への速い集積は Ku80 との相互作用に依存する)		
	(主 査)		
論 文 審 査 委 員	教授 石 岡 千加史	教授 貫 和 敏 博	
	教授 小 野 哲 也		

## 論文内容要旨

家族性乳癌遺伝子 *BRCA1* は家族性乳癌卵巣癌の 60%, 10% が遺伝性の上皮性卵巣癌の 40% で変異が検出される重要な癌抑制遺伝子である。これまでの研究により, *BRCA1* は DNA 修復, 転写制御, 細胞周期調節, クロマチンリモデリングなど, 細胞内の様々な機構に関与することが明らかになっている。その中で, *BRCA1* の DNA 修復能は, 癌化との直接的な関与が示唆され, 特に興味深い。本研究では, *BRCA1* の DNA 二重鎖切断部位での働きを詳しく検討するために, レーザー照射によって, 生細胞の核の一部に DNA 二重鎖切断を特異的に作成し, 修復タンパクの集積と解離をリアルタイムで解析できる新しい方法を用いて, *BRCA1* の DNA 二重鎖切断部位における集積と解離を解析した。

まず, GFP を付加した *BRCA1* の野生型と各種欠失変異体の発現ベクターを作製し, DNA 二重鎖切断部位への集積を解析した。*BRCA1* は, N 末端に RING ドメイン, C 末端に BRCT ドメインという特徴的な構造が存在するため, N 末端または C 末端の欠失が DNA 二重鎖切断への集積に影響を与えると予想した。しかし, *BRCA1* の N 末端と C 末端の両方が欠失した断片では集積は認められなかったが, *BRCA1* の N 末端と C 末端はそれぞれ独立に DNA 二重鎖切断に集積した。さらに, *BRCA1* の N 末端と C 末端の集積パターンを比較したところ, N 末端は, レーザー照射後直ちに集積するのに対して, C 末端は徐々にゆっくりと集積した。次に, 他の DNA 修復因子との関係を調べるため, 他の DNA 修復因子の欠損細胞における, *BRCA1* の DNA 二重鎖切断への集積を解析した。H2AX, ATM, DNAPKcs 欠損細胞では, *BRCA1* の N 末端, C 末端とも DNA 二重鎖切断へ集積し, 影響は見られなかったが, Ku80 欠損細胞において, *BRCA1* の N 末端が DNA 二重鎖切断へ集積できなかった。さらに, *BRCA1* と Ku80 との相互作用を解析したところ, *BRCA1* は Ku80 と相互作用し, この相互作用は DNA 障害によって増強し, *BRCA1* の N 末端を介することが分かった。また, GFP 付加した *BRCA1* の N 末端の 6 種類の小断片の発現ベクターを作製し, DNA 二重鎖切断への集積能を解析したところ, これまで *BRCA1* の機能において重要とされてきた RING ドメインのある領域とは異なった, 100 から 200 アミノ酸の断片も, DNA 二重鎖切断へ集積することが分かった。さらに, この領域に腫瘍由来の点突然変異を導入し DNA 二重鎖切断への集積を解析したところ, DNA 二重鎖切断への集積は減弱し, これらの点突然変異による集積の減弱が, 癌化に関与することが示唆された。BARD1 は *BRCA1* の N 末端と直接結合するタンパクとして同定され, *BRCA1* と同様に, N 末端に RING ドメイン, C 末端には 2 つの BRCT ドメインを持つ。*BRCA1* の N 末端, Ku80 と BARD1 の DNA 二重鎖切断に対する集積のパターンを検討したところ, Ku80 は *BRCA1* の N 末端と同様にレーザー照射後直ちに集積したが, BARD1 はゆっくりと徐々に集

積し、BRCA1のN末端とは異なった集積パターンを示した。さらに、免疫沈降法により、BRCA1-BARD1複合体とBRCA1-Ku80複合体が別の複合体であることが分かった。

以上より、BRCA1のDNA障害部位への集積には二つのメカニズムが存在し、そのうちのBRCA1の速い集積はKu80との相互作用に依存することが明らかとなり、BRCA1はDNA二重鎖切断の修復に多機能に作用することが示唆された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本博士論文は、家族性乳癌遺伝子である *BRCA1* の遺伝子産物 BRCA1 の DNA 二重鎖切断修復機能について、レーザー照射法により BRCA1 の DNA 二重鎖切断部位における集積と解離をリアルタイムで解析したものである。

その結果、申請者は、(1) BRCA1 の N 末端と C 末端はそれぞれ独立して DNA 二重鎖切断に集積すること、(2) BRCA1 の N 末端と C 末端の集積パターンの比較から、N 末端は、レーザー照射後直ちに集積、C 末端は徐々に集積すること、(3) 各種 DNA 修復因子の欠損細胞においては、H2AX、ATM および DNAPKcs 欠損細胞では BRCA1 は DNA 二重鎖切断へ集積したが、Ku80 欠損細胞においては BRCA1 の N 末端が DNA 二重鎖切断へ集積できないこと、(4) BRCA1 は Ku80 と相互作用し、その相互作用は DNA 障害によって増強すること、およびその結合は BRCA1 の N 末端を介すること、(5) N 末端の中で RING ドメインとは異なる第 100 から第 200 アミノ酸の断片も、DNA 二重鎖切断へ集積すること、(6) この第 100 から第 200 アミノ酸の断片に腫瘍由来の点突然変異を導入すると、DNA 二重鎖切断への集積は減弱すること、(7) Ku80 は BRCA1 の N 末端と同様にレーザー照射後直ちに集積したが、BRCA1 結合タンパク質である BARD1 は徐々に集積し、BRCA1 の N 末端とは異なった集積パターンを示すこと、及び (8) 免疫沈降法により、BRCA1-BARD1 複合体と BRCA1-Ku80 複合体が別の複合体であること、を明らかにした。

これらの結果は、BRCA1 の DNA 障害部位への集積には、Ku80 との相互作用に依存する速い集積と BARD1 との相互作用に依存する遅い集積の二つのメカニズムが存在することを強く示唆するものであり、BRCA1 の DNA 二重鎖切断修復機能には複数の分子が関わることを明らかにした新規性のある研究と認められる。また、本博士論文の研究成果は、将来、乳癌の診断や治療法の開発に発展しうる可能性がある。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。